



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/38, 7/01, A61K 39/245, 39/255</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/18215</p> <p>(43) 国際公開日 1999年4月15日(15.04.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04468</p> <p>(22) 国際出願日 1998年10月2日(02.10.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/271445 1997年10月3日(03.10.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本ゼオン株式会社(NIPPON ZEON CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8323 東京都千代田区丸の内2丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 斎藤修治(SAITO, Syuji)(JP/JP) 奥田尚志(OKUDA, Takashi)(JP/JP) 〒210-8507 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目2番1号 日本ゼオン株式会社内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: AVIAN INFECTIOUS HERPESVIRUS RECOMBINANTS AND RECOMBINANT VACCINES PREPARED WITH THE USE OF THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 鳥類感染型ヘルペス属ウイルスの組み換え体、およびこれを利用した組み換えワクチン</p> <p>(57) Abstract Turkey herpesvirus (HVT) recombinants or Marek's disease virus (MDV) recombinants constructed by integrating a heterogenous gene, in particular, a heteroantigen gene into the non-essential region of the HVT genome or the MDV genome, thus providing HVT recombinants carrying a foreign gene inserted into the gene region which is the untranslated region of the HVT genome; and vaccines containing these HVT recombinants.</p>		

(57)要約

七面鳥ヘルペスウイルス(HVT) のゲノムまたはマレック病ウイルス(MDV) のゲノムの非必須領域に異種遺伝子、とりわけ、異種抗原遺伝子を組み込んで組み換えHVT およびMDV を作製し、それらを利用したワクチンを製造する。本発明によれば、七面鳥ヘルペスウイルスゲノム中の非翻訳領域である遺伝子領域に外来遺伝子が挿入された組み換え七面鳥ヘルペスウイルスおよび当該組み換え七面鳥ヘルペスウイルスを含有するワクチンが提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レント	SL シェラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明 細 書

鳥類感染型ヘルペス属ウイルスの組み換え体、およびこれを利用した組み換えワクチン

発明の分野

本発明は、七面鳥ヘルペスウイルス（以下、HVT ということがある）のゲノムまたはマレック病ウイルス（以下、MDV ということがある）のゲノムの非必須領域に外来遺伝子を組み込んだ組み換えHVT およびMDV、及びそれを利用したワクチンに関する。

背景技術

従来、遺伝子組み換え手法を使ったウイルスベクターワクチンは、ポックスウイルス属をベクターとしたワクチン（Ogawa R. ら、Vaccine, 8 : 486-490 (1990)）、アデノウイルスをベクターとしたワクチン（Hsu, K. H. ら、Vaccine, 12 : 607-612 (1994)）、バキュロウイルスをベクターとしたワクチンのほか、ヘルペスウイルス属をベクターとしたワクチン（Shin, M. -F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 5867-5870 (1984)）が知られている。中でもヘルペスウイルス属の遺伝子組み換えベクターワクチンは近年盛んに研究されている。

外来抗原遺伝子を発現させるウイルスベクターとして用いるウイルスは、ヒトヘルペスウイルス(HSV) やオーエスキー病ウイルス(PRV)(Van Zijl M. ら、J. Virol., 65 : 2761-2765 (1991))、七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)(Morgan R. W. ら、Avian Dis. 36 : 858-870 (1992))、マレック病ウイルス(MDV) などが知られている。これらの中でもHVT ウイルスおよびワクチン株MDV は接種対象動物と

なる家禽での安全性が高く、ワクチン特性も良好であることから、鳥類に対するベクターウイルスとして注目されている。

また、HVT およびMDV の感染様式として、感染細胞から他の細胞にウイルスが感染する際、ウイルスが感染細胞から一旦血中に放出されてから他の細胞に感染するというボックスウイルスのような感染様式をとらず、隣り合う細胞へ、細胞間－細胞間で感染が成立する。このため、血流中に存在するHVT またはMDV 特異的抗体の影響を受けにくい。

従来、親鳥からの移行抗体(Maternal antibody) の存在によって、ウイルス生ワクチンの効果が減弱され、十分な効果を発揮できないという問題があった。

近年、鶏へのワクチン接種法の一つとして、発生途中の鶏卵内にワクチンを接種する方法も開発され、HVT またはMDV のワクチンとしての有用性も認められている。

しかしながら、組み換えHVT もしくはMDV でこれまで知られている遺伝子組み換え領域は、TK領域 (Ross L. ら、16th International Herpes virus Workshop (1991)), US10領域 (Sakaguchi M. ら、Vaccine, 12 : 953-957 (1994)), US2 領域 (Sondermeijer, P. J. ら、Vaccine, 11 : 349-358 (1993)) などのHVT の生存に非必須と考えられる遺伝子の中に外来抗原遺伝子を組み込むという報告ばかりであった。このような非必須領域への組み込みは、外来遺伝子を、非必須とはいえ本来HVT で発現すべき遺伝子、すなわち抗原決定基となる遺伝子の代わりに発現させるため、HVT もしくはMDV の抗原性を減弱させる可能性がある。そればかりでなく、挿入部分のオープン・リーディング・フレーム(ORF) の転写及び翻訳に関係した遺伝子機構 (エンハンサー、プロモーター、ターミネーターなど) が、挿入遺伝子の発現に対して悪影響を及ぼす可能性を否定で

きない。

事実、多くのウイルスで、非必須と考えられるタンパク質をコードする遺伝子領域を欠失させたり、その部分に外来遺伝子を組み込んだりした場合に、ウイルスの形状が変化したり抗原性が低下したりすることが報告されている。さらに、弱毒ワクチンの調整方法としても、外来遺伝子を組込む方法が用いられているケースがある。

また、TK領域に外来遺伝子を挿入して発現させたときに、発現遺伝子の抗原性が低下するという報告もある（Ross L. ら、J. Gen. Virol., 74 : 371-377 (1993)）。さらに、特定のORF 内に挿入できる抗原遺伝子の長さが限られてしまうため、多くの抗原遺伝子を挿入できないなど、ワクチンとして多くの問題点がある。

本発明者らは、かかる問題点を解決すべく鋭意研究を進めた結果、何種類もの外来抗原遺伝子を挿入でき、かつ安定的に抗原タンパク質を発現できるHVT またはMDV の遺伝子挿入領域、つまりここでいうHVT またはMDV の非翻訳領域を見だし、その部分に種々の外来抗原遺伝子を挿入できること、そしてこれらの外来抗原遺伝子が挿入された組み換えHVT またはMDV を作製し、これらの組み換えウイルスを宿主に感染させることにより、宿主側に十分なワクチン効果を付与する事を見だし、本発明を完成するに至ったのである。

発明の開示

本発明の発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、鳥類感染型ヘルペス属ウイルスに属するウイルスの非翻訳領域中の特定の部位に外来遺伝子を挿入した組み換えウイルスを作製し、この組み換えウイルスをワクチンとして使用できることを見出し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は、ゲノム中の非翻訳領域である遺伝子領域に

外来遺伝子が挿入された、鳥類感染型組み換えヘルペス属ウイルスに関する。ここで、上記ウイルスは、好ましくは七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)またはマレック病ウイルス(MDV)である。

前記の非翻訳領域は、好ましくは、ヒト単純ヘルペスウイルスの各オープン・リーディング・フレームに相当する七面鳥ヘルペスウイルスまたはマレック病ウイルスのオープン・リーディング・フレームの間に存在する非翻訳領域であり、特に好ましい外来遺伝子挿入部位は(1) UL44とUL45の間、(2) UL45とUL46の間、(3) UL41とUL42の間、(4) UL40とUL41の間、(5) gB遺伝子の下流領域、(6) UL53とUL54の間、および(7) UL36とUL37からなる群から選ばれる少なくとも1箇所の挿入部位である。

上記外来遺伝子は、好ましくは、鳥類の感染症の病原体に由来する遺伝子であり、特に好ましくはウイルス、細菌、真菌、および原虫からなる群から選ばれる病原体由来の抗原遺伝子である。さらにまた、上記外来遺伝子は、好ましくは、ニューカッスル病ウイルス(NDV)、ガンボロ病ウイルス(IBDV)、伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)、伝染性気管支炎ウイルス(IBV)、マイコプラズマ(MG)、およびコクシジウムからなる群から選ばれる病原体由来の遺伝子である。

本発明はまた、上記の組み換えウイルスを有効成分とする鶏用ワクチンに関する。

発明の実施の形態

以下に、本発明を詳述する。

本発明で使用するウイルス

本発明で使用するウイルスは、鳥類に感染するウイルスのうち、ヘルペスウイルス属に属するもの(鳥類感染型ヘルペス属ウイルス

）であることが好ましい。これは、ヘルペスウイルス属に属するウイルスが、潜伏感染（latent infection）や持続感染（persistent infection）の状態で感染動物の体内に永続的に生存し続けるという性質を有するためである。

鳥類感染型ヘルペス属ウイルスのなかでも、特に、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）またはマレック病ウイルス（MDV）であることが好ましい。上記のウイルスは感染期間が長いために長期にわたってワクチン効果を感染した鳥類に付与できる可能性があり、ワクチンとしての有効性が期待されることによる。

HVT または MDV

本発明において使用する HVT または MDV は、天然に得られたり、ATCC などから有償または無償で入手できるものなどであればよく、特に限定されるものではない。

HVT の好ましい例としては、ガンマヘルペスウイルス亜科に属し、生来非病原性であり、かつ非腫瘍性のウイルスで家禽用のワクチンとして用いられているものが挙げられる。具体的には、FC126（ATCC VR-584B）、PB-THV1、H-2、YT-7、WTHV-1、HPRS-26などが挙げられ、例えば、FC126株を好適に使用することができる。また、MDV としては、具体的には、CV1988やSB1などを挙げるができる。

本発明の組み換えウイルスを作製するためには、まず、上記のウイルスを適当な宿主細胞中で増殖させ、ゲノムDNAを得る。そして、このゲノムDNA中の非翻訳領域を確認し、その領域に、後述する外来遺伝子を挿入する。

ウイルスを増殖させるための宿主および増殖条件は、増殖させようとするウイルスに応じて適宜選択する。例えば、HVTを増殖させる場合には、宿主細胞としてCEF、発育鶏卵、鶏腎細胞などを用い

る。Eagle's MEM、ライボビッツ L-15/マッコイ 5 A (1:1 混合) 培地などの中で、37℃前後にて、3～4 日間培養する。

以上のように培養した細胞から定法に従って DNA を抽出する。すなわち、単層培養した細胞をはがし、遠心上清をとり、リシスバッファーでタンパク質を変性除去した後に、フェノールとエタノールで DNA を抽出する。

このようにして得られたウイルスの DNA の非翻訳領域を後述のように確認する。

非翻訳領域とは、ORF を有さず、翻訳によって発現されるタンパク質のアミノ酸配列を規定していない塩基および ORF が転写、翻訳、タンパク質発現のいずれにも関与していない塩基領域をいう。この領域に含まれている塩基配列は、その領域が ORF を含むこととならない限り、塩基の置換、欠失、付加されたものであってもよい。

外来遺伝子挿入領域

外来遺伝子を挿入する領域を、外来遺伝子挿入領域といい、外来遺伝子を挿入する部位を外来遺伝子挿入部位という。

外来遺伝子挿入領域は、以下のようにして得ることができる。HVT または MDV の場合を例にとって説明する。

これらのウイルスの非翻訳領域を、以下のようにして得る。まず、全塩基配列が解明されているヒト単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) や、HVT と相同性の高い塩基配列を持つ MDV-1 など相互で配列が確定されている領域などから、非翻訳領域と推定される配列の前後の配列を選択する。

ついで、これらの配列をもとに DNA プライマーを合成し、HVT または MDV の DNA を鋳型として所定の条件でポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) を行い、特定の遺伝子を増幅することによって得られる。

この増幅された遺伝子にORF がないことをDNA 配列分析で確認し、ORF の転写および翻訳に関係した遺伝子機構（エンハンサー、プロモーター、ターミネーターなどを含む機構）なども存在しない位置を確認して、外来遺伝子挿入領域を決定する。

この領域がウイルスの増殖に非必須であり、外来遺伝子を導入できることを明らかにするために、この領域に、特異的な配列を付加し、もしくは欠失させ、または置換を行い、CEF(鶏胚繊維芽細胞)に感染させ、このような変化を生じさせた前後における感染性および増殖性の変化を調べる。

上記のような特定の配列の付加、欠失、置換などは、in vitro突然変異(in vitro mutagenesis)、PCR、部位特異的突然変異(site-directed mutagenesis)、および特公平6-16709号公報に記載された部位特定変異法など、一般的な手法を用いて行うことができる。

また、CEF に対しては、m. o. i. = 1 で感染させ、37℃で3～4時間インキュベートして増殖させ、ウイルスの増殖性、細胞の形態、プラークの形態、細胞の不老化を観察する。

この結果、塩基の変更前の株と細胞やプラークの形態に差がなく、また、ウイルスの増殖性も5回の繰り返し実験の平均で塩基の変更前の株との差が±20%以内であることを確認し、同部位を外来遺伝子の挿入が可能な領域（外来遺伝子挿入可能領域）と判断する。この際、外来遺伝子挿入領域は、非翻訳領域を含めて外来遺伝子挿入部位の前後10bp以上あればよく、好ましくは100bp 以上、より好ましくは500bp 以上あればよい。

外来遺伝子挿入部位は非翻訳領域内にあれば特に限定されるものではないが、具体例としては、(1) UL44とUL45との間およびUL45とUL46との間、(2) UL41とUL42、(3) UL40とUL41との間、(4) gB遺伝子の下流領域、(5) UL53とUL54との間、(6) UL36とUL

37との間、などが挙げられる。これらは、第16回国際ヘルペスウイルスワークショップ（1991年07月7～12日に米国カリフォルニア州パシフィックグローブで開催された）の予稿集中に、HSV-1について掲載されている。

これらの中でも、好ましいものとして、HSV-1だけでなく、MDVでも相同性がORFにおいて確認されている（1）および（4）を挙げることができ、より好ましくはORF間の非翻訳領域が推定できる（1）を挙げることができる。

外来遺伝子含有プラスミドの構築

外来遺伝子をHVTもしくはMDVの非翻訳領域に挿入するには、非翻訳領域を含んだ配列をプラスミドにクローニングしておく必要があるが、このプラスミドも特に限定されるものではない。

例えば、pBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC18、pUC19、pUC7、pUC8、およびpUC9などのプラスミド、ラムダファージ、M13ファージなどのようなファージ、pHC79などのコスミドを例示することができる。

これらのプラスミドに、上記のようにして得た非翻訳領域を常法によって組み込む。

このように組み込まれた非翻訳領域へ外来遺伝子を挿入するためには、上記のようなプラスミドなどにクローニングした非翻訳領域の特定の部分に変異を加えて新たな制限酵素切断部分を作り出し、そこに外来遺伝子を挿入する。

変異を加える方法は定法に従えばよく、*in vitro* mutagenesisやPCRなど当業者において通常用いられる方法を使用することができる。すなわち、PCR法では、PCRプライマーに1～2塩基の欠失、置換、付加などの変異を生じさせ、このプライマーを使用することにより変異を生じさせることができる。

ここで挿入する外来遺伝子とは、本来その領域には含まれていない自己由来の遺伝子、非自己由来の遺伝子の双方を含み、鳥類感染型ヘルペス属ウイルスの抗原遺伝子であることが望ましい。

このような遺伝子としては、例えば、鳥類の感染症の病原体に由来する遺伝子を挙げることができる。鳥類の感染症を引き起こす病原体としては、ウイルス、細菌、真菌、原虫などを挙げることができ、これらの病原体が有する抗原遺伝子、すなわち、抗原決定基をコードする遺伝子を好適に使用することができる。

このような病原体としては、具体的には、鶏の一生を通じて問題となるニューキャッスル病ウイルス(NDV)、ガンボロ病ウイルス(IBDV)、中雛以降で問題となる伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)、伝染性気管支炎ウイルス(IBV)、マイコプラズマ(MG)、およびコクシジウムなどを挙げることができる。

特に、中和抗原遺伝子または感染防御抗原と考えられる抗原の遺伝子が同定されている疾病では、これらの遺伝子をHVTやMDVなどの鳥類感染型ヘルペス属ウイルスに組み込むことによって、組み換えウイルスが感染した鶏の体内で抗原として発現させることが可能となることによる。また、これによって、効果的なワクチンとして使用することが可能になる。

具体的に、HVTまたはMDVなどの鳥類感染型ヘルペス属ウイルスに遺伝子を組み込んで組み換えウイルスを作製し、これらのウイルスに感染した鳥類の体内で発現されるタンパク質は、構造タンパク質、非構造タンパク質のいずれであってもよく、DNA配列のわかっているタンパク質であれば特に限定されない。

例えば、NDVでは、HNタンパク質、Fタンパク質、NPタンパク質が、また、IBVでは、Mタンパク質、Nタンパク質、スパイクタンパク質が挙げられる。IBDVでは、VP1～VP5の全タンパク質、ILTV

はヘルペスウイルスであることから、HSV-1やMDV、HVTと相同性のあるタンパク質（特にgBタンパク質やUL32相当タンパク質など）、マイコプラズマではアドヘシンタンパク質、HMW 関連タンパク質、40Kタンパク質、66Kタンパク質、67Kタンパク質など（国際公開公報W094/23019号に配列が記載）などが挙げられる。

したがって、これらのタンパク質をコードしている遺伝子を組み込むことが好ましい。このような外来遺伝子を、異種抗原遺伝子という。

また、異種抗原遺伝子をHVTまたはMDVで発現させるためには、異種抗原遺伝子上流域にプロモーター配列を組み込む必要がある。使用するプロモーターは、合成プロモーター、天然プロモーターのいずれであってもよく、HVTまたはMDVが感染した細胞内で保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能し得るものであれば特に限定されない。

このようなプロモーターとしては、HVTまたはMDVが保有している固有のプロモーターは無論のこと、HVTもしくはMDV以外のウイルス由来のプロモーターやDNA、または真核生物もしくは原核生物由来のものや合成プロモーターであっても上記要件を満たす限り、本発明において使用することができる。

具体的には、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター（Ross L. J., Gen. Virol. 74 : 371-377 (1993))、HVTおよびMDVのgBタンパク質プロモーター（前出）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）のIEプロモーター（Alting-Mees M. A., Nucleic Acid Res., 17 : 9494 (1989))、SV40プロモーター（Gunning P., Proc. Natl. Acad. Sci., 84 : 4831-4835 (1987))、ヒトおよび鶏の β アクチンプロモーター（前出、およびKost A. T., Nucleic Acid Res., 11 : 8287-8301 (1983))、 β -グロビンプロモーター（Spitzn

er J. R., Nucleic Acid Res., 18 : 1-11 (1990)), ラウス肉腫ウイルス(RSV) のLTR プロモーター (Fiek A. ら、Nucleic Acid Res., 20 : 1785 (1992))などが挙げられる。その他、HVT またはMDV の構造タンパク質や必須遺伝子のプロモーターを利用することができる。

上述した非翻訳領域に、特定のプロモーターの支配下において外来抗原遺伝子が発現するような形でこれらを組み込み、プラスミドを構築する。このようにして構築されたプラスミドは、HVT およびMDV ゲノムの特定領域と組み換えを起こして組み換えウイルスを作ることができる。

組み換えウイルスの作製

鳥類感染型ヘルペス属ウイルスのゲノムの非翻訳領域内への上記のような外来遺伝子の挿入は、定法に従って行えばよい。HVT の場合を例にとって説明する。

まず、上記のようにして得たHVT 非翻訳領域内に外来抗原遺伝子が挿入されたプラスミドを、HVT 感染細胞に、エレクトロポレーションや、リン酸カルシウム法、リポフェクチンを用いた方法や遺伝子銃などで導入する。導入効率の高さから、エレクトロポレーションやリポフェクチンを用いた方法を採用することが好ましい。導入するプラスミドの量を、0.1 ~ 1000 μ g の範囲とすると、このようなプラスミドを導入した細胞内における、HVT-DNA とプラスミドの相同領域との間での組み換えウイルスの発生率が高くなる。

このようにして誕生した組み換えHVT のみを選択するためには、プラスミドの非翻訳領域に1または複数の外来遺伝子を組み込み、そのうちの少なくとも1つを特定の基質を発色させる酵素遺伝子としておくといよい。このような酵素遺伝子の例としては、例えば、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が挙げられる。

β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む組み換えHVTは、ブルオガルなどの基質の添加により特定の色を呈するため、非組み換えウイルスと明確に区別できる。したがって、このような遺伝子を組み込んだウイルスに感染させた細胞を、特定の基質を添加した培地中で培養することにより、発色したウイルス感染細胞を選択することができる。この操作を繰り返すことによって、組み換えウイルスを純化することができる。

生ワクチン

本発明の生ワクチンの調製方法は特に限定されないが、たとえば次の方法によって調製することができる。

本発明の組み換えウイルスの感染細胞を当該ウイルスが生育できる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させた後、細胞をスクレーパーまたはトリプシンではがし、遠心分離によって感染細胞と上清とに分離する。

宿主細胞としては、トリ由来の細胞が好ましく、CEF（ニワトリ胚繊維芽細胞）、鶏腎細胞などを好適に使用することができる。

得られた感染細胞は、10%のジメチルスルフォキシド（DMSO）を含む培養用培地に懸濁し、液体窒素存在下で凍結保存する。ワクチンとして使用するときは100倍量のリン酸緩衝液にこの凍結保存品を溶かして使用する。

液体窒素下で上記感染細胞を保存するための安定剤やその他の成分は、ウイルス感染細胞が安定的に生存でき、かつレシピエントにとって薬理学的に問題のない成分であれば特に限定されない。

本発明の生ワクチンの家禽への投与方法は特に限定されないが、皮下に注射により接種する方法が一般的に用いられており、現行のHVTワクチンと同じである。接種量も従来ワクチンと同様でよい。

本ワクチンはヘルペス属ウイルス感染症用ワクチンとしてだけで

なく、非翻訳領域に挿入した抗原遺伝子によって、それらの遺伝子が由来する病原体によって惹起される疾病のワクチンとして使用することができる。本発明のワクチンは、有用な組み換えHVT 多価ワクチンとして使用することができる。

実施例

以下に実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

実施例 1. HVT-DNA の調製

HVT-DNA の調製は、基本的にLee らの方法 (J. of Virol., 7 : 289-294 (1971)) に準じて行った。

先ず16cm 培養皿で、ライボビッツ/マッコイ 5 A (1 : 1) 混合培地中37℃で4日間培養したHVT(FC-126 株) 感染細胞 (5×10^7 個) をスクレーパーで剥がし、低速 (2,000rpm、5 分) で遠心分離した。遠心上清をすて、沈殿した感染細胞の10倍量にあたるリシスバッファー (0.15M NaCl, 0.1M EDTA, 1% SDS, $100 \mu\text{g/ml}$ の Proteinase K) を加えた。

37℃で一昼夜保温した後、等量のフェノールを加えてタンパク質を変成させ、この操作を2回繰り返して HVT-DNA を抽出した。抽出したDNA はエタノール沈殿によって回収した。

実施例 2. pNZ45/46Sfi の構築

MDV-1 型のgCh(Coussensら、J. Gen. Virol., 62 : 2373-2379 (1981)) 遺伝子とそれに隣接する BamHI-B フラグメントの EcoRI-BamHI 断片 (特開平 6-292583号公報) の情報をもとにして、ORF の間にSfiI部位を導入できるように合成DNA(プライマー 1~4) を設計した。

ここで、上記のCoussensらの文献ではUL44および45が記載されて

おり、特開平 6 - 292583号公報にはUL46が記載されている。

このプライマーを用いて以下のようにPCR を行い、pUC18 にクローニングした。

HVT-FC126 株感染CEF より、実施例 1 の方法でDNA を取得し、このDNA 100ng をテンプレートとして用いた。また、プライマー 1 (CCCCGAATTC ATGGAAGAAA TTTCC ; 配列番号 1) とプライマー 2 (CGCGGGCCTT ATTGGCCAAA ACACACCTCT AACGGTTACT ; 配列番号 2) からなるプライマーセット A (それぞれ50pmol) およびプライマー 3 (GCGCGGCCAA TAAGGCCAA ACACAGTAAC CGTTAGAGGT ; 配列番号 3) とプライマー 4 (CCCCAAGCTT TCAAGTGATA CTGCGTGA ; 配列番号 4) とからなるプライマーセット B (それぞれ50pmol) とを用いて、通常の方法でPCR を行った。30サイクルで反応を停止させ、それぞれ約10 μ g の増幅産物を得た。

これら 2 つのPCR 産物を混合したもの (混合比 1 : 1、それぞれ 100ng を混合したもの) をテンプレートとして、プライマー 1 とプライマー 4 とを用いて、45℃ 1 分、60℃ 2 分、73℃ 3 分を 1 サイクルとして30サイクルPCR を行うことにより、UL45h およびUL46h の ORF の間にSfiI部位を導入した。

得られた増幅産物をEcoRI とHindIII で切断し、その断片をpUC18 の EcoRI-HindIII 部位にT 4 リガーゼ (宝酒造社製) 4 ユニットを用いて16℃で、30分間インキュベートして挿入し、pNZ45/46Sfi を構築した。

実施例 3. pNZ44/45fiの構築

実施例 2 と同様に、HVT-FC126 株感染CEF より取得したDNA(100ng)をテンプレートとして、プライマー 1 およびプライマー 5 (GCGGCCAA TAAGGCCAAC ATCGGGACGT ACATCAT ; 配列番号 5) からなるプライマーセット C (それぞれ50pmol) およびプライマー 6 (GC

GCGGCCTT ATTGGCCTTA AATACCGCGT TTGGAGTAAA ; 配列番号 6) とプライマー 4 からなるプライマーセット D (それぞれ 50pmol) とを用いて、実施例 2 と同様にして PCR を行った。それぞれ約 10 μ g の増幅産物が得られた。

これら 2 つの PCR 産物を混合したもの (混合比 1 : 1、それぞれ 100ng を混合したもの) をテンプレートとして、プライマー 1 (50pmol) とプライマー 4 (50pmol) とを用いて実施例 2 と同様にして PCR を行うことにより、UL44h (MDV1 の HSV-1 に対応する gCh または gA) および UL45h の ORF の間に SfiI 部位を導入した。

この産物を EcoRI と HindIII とで切断し、得られた断片を pUC18 の EcoRI-HindIII 部位に実施例 2 と同様にして挿入し、pNZ44/45 Sfi を構築した。

実施例 4. pG1MCSpolyASfi の構築

(1) ドナープラスミド pGTPs の構築

pUC18 の HindIII-PstI 部位に、合成 DNA (5' - AGCTGCCCCCGGCAAGCTTGCA - 3' (配列番号 7)) を挿入し、その後 DNA ポリメラーゼでこの部分を二本鎖とした。次いで、得られたプラスミドの SalI-KpnI 部位に合成 DNA (5' - TCGACATTTTATGTAC - 3' (配列番号 8)) を挿入し、同様に DNA ポリメラーゼで二本鎖とした。さらに、ここで得られたプラスミドの SacI-EcoRI 部位に、2 本の合成 DNA (5' - AATTGCGCCGGGGGGCCAGCT - 3' (配列番号 9)) および (5' - GGCCCCCGGCGG - 3' (配列番号 10)) をアニールさせたものを購入し、最後にこのプラスミドの HindIII-SacI 部位にプラスミド pNZ1729R (Yanagida et al., J. Virol., 66 : 1402-1408 (1992) を HindIII と SalI とで消化して得られた約 140bp の DNA 断片を挿入して、プラスミド pGTPs を構築した。

(2) pGIMCSpolyAsfi の構築

pUC18をDraIで切断し、XhoIリンカー（宝酒造社製）を実施例2と同様にして挿入し、XhoIサイトを導入したpUC18Xを構築した。

このpUC18XをHindIIIとPstIで切断し、合成DNA 1（AGCTTGCCAA TAAGGCTGCA；配列番号11）と合成DNA 2（ATGGCCCGCC GGCTGACCG C；配列番号12）とをアニールした断片を作製した。これをT4ライゲース（宝酒造社製）を用いて上記のXhoIサイトに挿入し、pU18XGを構築した。

このpU18XGのKpnI-EcoRI部位に、ポリA付加シグナルおよびSfiIサイトを導入するために、合成DNA 3（GCGGTCAGCC GGCGGGCCAT；配列番号13）と合成DNA 4（GGTAAACTGC AGACTTGGCA GT；配列番号14）とをアニールした断片をT4ライゲースによって挿入し、pUCpolyASfiを構築した。

このpUCpolyASfiのKpnI-BamHIサイトに、実施例4（1）に記載のpGTPsのKpnI-BamHI断片36bpを挿入し、pMCSpolyASfiを構築した。

このpMCSpolyASfiのHindIII-PstIサイトに合成DNA 5（ACTGCC AAGT CTGCAGTTTA CC；配列番号15）を実施例2と同様にして挿入し、pGIMCSpolyASfiを構築した。

実施例 5. pRSVおよびpCMVの構築

pBK-RSV（STRATAGENE社製）からNsiIとNheIとを用いて二重消化して切り出したRSVプロモーターを含む約600bpのNsiI-NheI断片を、実施例3で得られたpGIMCSpolyASfiのPstI-XbaI部位に実施例2と同様にして挿入し、pRSVを構築した。

同様に、pBK-CMV（STRATAGENE社製）のCMVプロモーターを含むNsiI-NheI断片を切出し、実施例3で得られたpGIMCSpolyASfiのPstI-XbaI部位に実施例2と同様にして導入して、pCMVを構築した。

実施例 6. pCMV-HN(BglI-)の構築

(1) pCMVのCMV プロモーターからのBglI部位の欠失

pCMV のCMV プロモーター内には、BglI部位が3箇所存在するため、BglI部位を欠失させるために、以下のようにPCR を行って変異を導入した。変異は次の方法によって行った。

実施例5で構築したpCMV(100ng)をテンプレートにして、プライマー7(配列番号12)とプライマー8(配列番号15)とからなるプライマーセットE、M13P7プライマー(東洋紡績株式会社製)とプライマー9(配列番号13)からなるプライマーセットFとを用いて、実施例2と同様の条件でPCRを行った。それぞれ約10 μ gの増幅産物を得た。

上記2つのプライマーセットを用いて得た増幅産物100ngを混合比1:1で混合し、その混合物をテンプレートとして、今度は、M13P7プライマーとプライマー8とを用いて実施例2と同様にPCRを行い、PCR産物(1)を約10 μ g得た。

同様にpCMV(100ng)をテンプレートにして、プライマー10(配列番号14)とプライマー11(GGCATAATGC ATGGCGGGCC AT; 配列番号17)とのセットF、およびプライマー12(ATGGCCCGCC ATGCATTATGCC; 配列番号16)とM13P8プライマー(東洋紡績株式会社)とで、実施例2と同様にしてPCRを行った。

同様に、これら2つのプライマーセットの産物それぞれ100ngを1:1で混合した混合物をテンプレートとして、今度は、プライマー10とM13P8プライマーのプライマーでPCRを行い、PCR産物(2)を約10 μ g得た。

さらに、PCR産物(1)と、PCR産物(2)とを混合し、M13P7プライマーとM13P8プライマーとを用いて実施例2と同じようにPCRを行うことにより、BglI部位を欠失したCMV プロモーターを得ることができた。

(2) pUCCMVの構築

また、pUC19 のPstI-XbaI部位に、pBK-CMV(STRATAGENE社)のCMV プロモーターを含む約600bp のNsiI-NheI断片を実施例2のようにして挿入して、pUCCMVを構築した。

(3) pNZ87 の構築

(3-1) 7.5 Kプロモーターに β -ガラクトシダーゼ遺伝子が連結されたプラスミド(pNZ76)の作製

10 μ g のpMA001(Shirakawaら、Gene. 28 : 127- (1984))をBamHIで消化後、フェノール：クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈殿により、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(約3.3kb)を回収した。

一方、0.3 μ g のpUC19 をBamHIで消化後、フェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収し、上記で調製した β -ガラクトシダーゼ遺伝子とライゲーションし、ハイブリッドプラスミドpNZ66 を作製した。

40 μ g のpUWP-1 (ワクチニアウイルスWR株の7.5 KダルトンのペプチドをコードするDNAのプロモーターを含むプラスミド)をHpaIIとEcoRIとで消化し、1.5%低融点アガロース電気泳動(70V, 6時間)により、7.5Kプロモーターを含む約0.26kbの断片を分離し、フェノール：クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。このDNA断片の接着末端をDNAポリメラーゼにより平滑末端とした。

0.3 μ g のpNZ66 をHincIIで消化し、フェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により断片を回収し、上記の約0.26kbの7.5Kプロモーター遺伝子をライゲーションし、得られたハイブリッドプラスミドをpNZ76と命名した。

(3-2) ハイブリッドファージmp10-HN180 からプロモーター

およびその支配下にNDVのHN遺伝子DNAを連結したハイブリッドプラスミドpNZ87の作製

pNZ76をBamHIで消化し、0.8%アガロースゲルより、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含まない約2.9kbの断片を回収した。

一方、ハイブリッドファージmp10-HN180をBgIIIとBamHIとで消化後、0.8%アガロースゲルより約1.8kbのHN遺伝子のDNA断片を回収した。

両者をリガーゼにより連結し、得られたプラスミドでコンピテントな大腸菌TG-1株を形質転換し、常法に従ってプラスミドを抽出し、HN遺伝子を含むハイブリッドプラスミドを検出し、これをpNZ-87と命名した。

(4) pNZ87CMVの構築

次に、(3)で構築したpNZ87から、NDVのHN遺伝子を含む約1.8kbのBamHI-SacI断片を切り出した。この断片をpUCCMVのBamHI-SacI部位に実施例2と同様にして挿入して、pNZ87CMVを構築した。

このpNZ87CMVのCMVプロモーター領域にはBglI部位が含まれるので、CMVプロモーター領域を含むHindIII-BamHI断片を(2)でPCRにより構築したBglI部位を欠失したCMVプロモーターのHindIII-BamHI断片と実施例2に記載したようにして入れ替えて、pCMV-HN(BglI-)を構築した。

実施例7. pRSV-Fの構築

(1) pUCRSV-pAの構築

pUC19のPstI-XbaI部位に、pBK-RSV(STRATAGENE社)のRSVプロモーターを含む約600bpのNsiI-NheI断片を実施例2に記載したようにして挿入し、pUCRSVを構築した。

これとは別に、pBK-RSV(STRATAGENE社、100ng)をテンプレート

として、プライマー13 (CGGGAGCTCT AATTGTTTGT G ; 配列番号18) とプライマー14 (CGGGAATTCG CTTACAATTT ; 配列番号19) のプライマー (それぞれ50pmol) とを用いて、実施例2と同様にしてPCRを行うことによって、pBK-RSVに含まれるSV40プロモーターのpA付加シグナルを持つ断片を作製した。

このPCRで増幅した断片をSacIとEcoRIとで二重消化して、pUCRSVのSacI-EcoRI部位に実施例2に記載のようにして挿入することにより、pUCRSV-pAを構築した。

(2) pNZ98の構築

NDVのF遺伝子およびHN遺伝子を含むプラスミドXLIII-10H (Virus Research. 7: 241-255 (1987))を使用した。

4 μ gのプラスミドXLIII-10HをXbaIで消化し、生じた付着末端をDNAポリメラーゼで平滑末端とし、フェノールクロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈殿により回収した。回収したDNAをBamHIで消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動して、約2.1kbのF遺伝子を完全に含む断片を回収した。

一方、上記のようにして作製したpNZ76をBamHIとSmaIで二重消化し、lacZ遺伝子部分を除いた約3.0kbのBamHI-SmaI断片を回収した。回収したこの断片と、約2.1kbのF遺伝子を完全に含む断片とをリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌TG1株を形質転換した。

50 μ g/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育してきたコロニーから、上記と同様の操作によってプラスミドを調製した。制限酵素(BamHIとSmaI)でこのプラスミドを切断し、目的のクローンを確認し、pNZ98'と命名した。このpNZ98'には、F遺伝子全長の他、HN遺伝子の5'-末端約300bpが含まれる。この部分を除去するために、pNZ98'をSmaIとKpnIとで二重消化し、約4,150bpのSmaI-

KpnI断片を 0.8%アガロースゲル電気泳動により回収した。また、pNZ98'をSmaIとAvaIIとで同様に二重消化し、約650bpのSmaI-AvaIIを1.5%アガロースゲル電気泳動により回収した。

これら2つの断片を混合し、DNAポリメラーゼによって付着末端を平滑末端とした後にコンピテントな大腸菌TG1を形質転換し、形質転換体を得た。50 μ g/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地上でこの形質転換体を生育させ、形成されたコロニーより上述のようにしてプラスミドを得た。このプラスミドをSmaIで再び消化し、切断されたものを選択してプラスミドpNZ98を得た。

(3) 上記(2)で構築したpNZ98から、NDVのF遺伝子を含む約1.8bpのBamHI-SacI断片を切り出し、pUCRSV-pAのBamHI-SacI部位に実施例2に記載したようにして挿入し、pNZ98RSV3'を構築した。

また、pNZ98をPstIで切断したのち、BamHIにて部分消化を行い、125bpの断片を回収した。

この回収した断片とpNZ98RSV3'に含まれるPstI-BamHI断片75bpと交換して、pNZ98RSVpAを構築した。

実施例5で構築したpRSVのMluI-SacI切断2,892bp断片と、pNZ98RSVpAのNDVのF遺伝子を含むMluI-SacI切断2,262bp断片をライゲーションすることによって、pRSV-Fを構築した。

実施例 8. pCMV-VP2S(Okayama) の構築

(1) pCMV/MCS の構築

実施例6で構築したpCMV-HN(BglII-)のBamHI-KpnI部位に、pBluescript SK+のBamHI-KpnI断片62bpを実施例2に記載したように挿入し、pCMV/MCSを構築した。

(2) pCMV/MCSpA の構築

これとは別に、実施例7と同様に、pBK-RSV(STRATAGENE社)を

テンプレートとして、プライマー15 (CGGGGGCCCT AATTGTTTGT G ; 配列番号20) とプライマー16 (CGGGGTACCG CTTACAATTT ; 配列番号21) とを用いて、実施例2と同様にPCRを行い、SV40のpA付加シグナルを持つ断片を作製した。

このPCRで増幅した断片をApaIとKpnIとで二重消化して、pCMV/MCSのApaI-KpnI部位に実施例2に記載したように挿入することにより、pCMV/MCSpAを構築した。

(3) pCMV-VP2Sの構築

さらに、IBDV野外分離株岡山株より、常法によりRNAを抽出し、リバーストランスクリプターゼとcDNA合成キット(宝酒造製)とを用いてcDNAを作製した。

このcDNAをテンプレートとして、VP2に相当する領域を特開昭62-503006号公報に記載された遺伝子配列を元にして、プライマー17 (GCAAGCTTGC GATGACGAAC CTGC ; 配列番号22) とプライマー18 (GCGTCGACTC ACCTCCTTAG GGCCC ; 配列番号23) とを設計した。

これら2つのプライマーを用いて実施例2と同様にPCRを行うことによってIBDVのVP2に相当する領域を取得した。

これとは別に、pCMV/MCSpAをHindIIIで部分消化し、ついでSalIで部分消化して3,687塩基対の断片を得た。上記のPCRによって取得したIBDVの断片をHindIIIとSalIとで二重消化し、これを3,687塩基対の断片に実施例2に記載したようにして挿入し、pCMV-VP2S(Okayama)を構築した。

実施例9. pUC18Xlacの構築

lacZのBamHI-SmaI断片(Yanagidaら、J. Virol., 66 : 1402-1408 (1992))を、実施例4で構築したpU18XGのBamHI-SmaI部位に実施例2に記載したようにして挿入し、pUC18Xlacを構築した。

実施例10. pNZ45/46RSVlacおよび pNZ44/45RSVlacの構築

(1) pNZ45/46RSVlacの構築

実施例2で構築した pNZ45/46Sfi のSfiI部位に、実施例5で構築したRSV プロモーターを含むpRSVのBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、 pNZ45/46RSV を構築した。

この pNZ45/46RSV のSfiI部位に、実施例9で構築したlacZを含むpUC18Xlac のBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、 pNZ45/46RSVlacを構築した。

(2) pNZ44/45RSVlacの構築

同様に、実施例3で構築した pNZ44/45Sfi のSfiI部位に、実施例5で構築したRSV プロモーターを含むpRSVのBglI断片を挿入して、 pNZ45/46RSV を構築した。

この pNZ44/45RSV のSfiI部位に、実施例9で構築したlacZを含むpUC18Xlac のBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、 pNZ44/45RSVlacを構築した。

実施例11. pNZ45/46VP2Sおよび pNZ44/45VP2Sの構築

(1) pNZ45/46VP2S

実施例10で構築した pNZ45/46RSVlacのSfiI部位に、実施例8で構築したIBDVのVP2遺伝子を含むpCMV-VP2S(Okayama) のBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、 pNZ45/46VP2Sを構築した。

(2) pNZ44/45VP2S

同様に、実施例10で構築した pNZ44/45RSVlacのSfiI部位に、実施例8で構築したIBDVのVP2遺伝子を含むpCMV-VP2S(Okayama) のBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、 pNZ44/45VP2Sを構築した。

実施例12. pNZ45/46HNF および pNZ44/45HNF の構築

(1) pNZ45/46HNF の構築

実施例10で構築した pNZ45/46RSVlacのSfiI部位に、実施例6で構築したNDVのHN遺伝子を含むpCMV-HN(BglI⁻)のBglI断片を実施例2に記載したようにして挿入し、pNZ45/46HNを構築した。さらにpNZ45/46HNのSfiI部位に、実施例7で構築したNDVのF遺伝子を含むpRSV-FのBglI断片を挿入して、pNZ45/46HNFを構築した。

(2) pNZ44/45HNFの構築

同様に、実施例10で構築した pNZ44/45RSVlacのSfiI部位に、実施例6で構築したNDVのHN遺伝子を含むpCMV-HN(BglI⁻)のBglI断片を挿入して、pNZ44/45HNを構築した。さらにpNZ44/45HNのSfiI部位に、実施例7で構築したNDVのF遺伝子を含むpRSV-FのBglI断片を挿入して、pNZ44/45HNFを構築した。

実施例13. pNZ45/46HNF - VP2Sおよび pNZ44/45VP2S - HNFの構築

(1) pNZ45/46HNF - VP2の構築

実施例12で構築した pNZ45/46HNFのSfiI部位に、実施例8で構築したIBDVのVP2遺伝子を含むpCMV-VP2S(Okayama)のBglI断片を挿入して、pNZ45/46HNF - VP2Sを構築した。

(2) pNZ44/45VP2S - HNFの構築

実施例11で構築した pNZ44/45VP2SのSfiI部位に、実施例6で構築したNDVのHN遺伝子を含むpCMV-HN(BglI⁻)のBglI断片を挿入して、pNZ44/45VP2S - HNを構築した。さらにpNZ44/45VP2S - HNのSfiI部位に、実施例7で構築したNDVのF遺伝子を含むpRSV-FのBglI断片を挿入して、pNZ44/45VP2S - HNFを構築した。

実施例14. 組み換えHVTの純化

トリプシンではがした単層のCEFを、Saline G (0.14M塩化ナトリウム、0.5mM塩化カリウム、1.1mMリン酸-水素二ナトリウム、

1.5mM リン酸二水素ナトリウム、0.5mM 塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁し、細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液(2×10^7 個)に、実施例11, 12および13で作製した組み換え用プラスミド pNZ44/45VP2S, pNZ44/45HNF, pNZ45/46VP2S, pNZ45/46HNF, pNZ44/45VP2S-HNF pNZ45/46HNF-VP2S をそれぞれ40 μ g と、実施例1で調製したHVTのDNAを100 μ g ずつ混合した。

この溶液を室温にて10分間放置した後、室温にてジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて、3.0KVcm⁻¹, 0.4msec, 25℃の条件下でエレクトロポレーションした。

プラスミド及びHVTのDNAを導入した細胞を、その後9cm径の培養用ディッシュ(Falcon社製)にまき、37℃にてHVT特有のプラークが形成されるまで約4日～5日間培養した。

プラークが形成された細胞を1%トリプシンではがし、同様にトリプシンではがしたCEF(2×10^7 個)の細胞と混合し、培養用96ウェル平底マルチプレート(Falcon社製)10枚に限界希釈した。これらのプレートを、37℃で各ウェルにHVT特有のプラークが形成されるまで、さらに、約4日～5日間培養した。ついで、各プレートの半数のウェルに β ガラクトシダーゼの発色基質であるブルオガル(Bluogal: Gibco社製)100 μ g/ml及び0.8%寒天を含むCEF培養用培地を100 μ l/wellずつ加え、37℃において約4時間インキュベートした。

その後、各ウェルの青プラーク数を数え、最も青プラーク数の多かったプレートを選択し、任意の20ウェルに1%トリプシンを加えて組み換えHVT感染細胞を含むCEFをそれぞれ回収し、 1×10^8 個の細胞と混合し、それぞれに培養用96ウェル平底マルチプレートに播いた。

培養用96ウェル平底マルチプレートから培養用96ウェル平底マルチプレートに一回継代する行程を一回のスクリーニングとしては、全ウェルが青ブランクになるまで繰り返し、ブルオガルを加えたときに全ブランクが青変するまで繰り返し、ウイルスを純化した。通常は、ほぼ5～10回のスクリーニングで純化できる。

9 cm径の培養用ディッシュ上で感染細胞を増殖させたのち、16cm径の培養用ディッシュで感染細胞をさらに増殖させ、組み換えHVTの力価を測定したところ、組み換えHVTの力価は $1 \sim 6 \times 10^5$ TCID₅₀であった。

各組み換え用プラスミドから作製された組み換えHVTを以下の表1ように呼ぶこととした。

表 1

組み換え用プラスミドの名称	組み換えHVTの名称
pNZ44/45VP2S	HF002
pNZ45/46VP2S	HF003
pNZ44/45HNF	HF004
pNZ45/46HNF	HF005
pNZ44/45HNF - VP2S	HF006
pNZ45/46HNF - VP2S	HF007

実施例 15. サザンハイブリダイゼーション

実施例14で調製した組み換えウイルスDNA(HF003, HF004)を実施例1のHVT-DNA抽出方法と同じ方法で抽出した。

得られた組み換えウイルスDNA(HF003, HF004)、その組み換え用プラスミド(pNZ45/46VP2S, pNZ44/45HNF)、及び親株ウイルスDNAを、BamHIで消化し、これらを0.8%アガロース電気泳動に供し、サザンプロットハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィで分析した。

使用したプローブは、pNZ45/46VP2SまたはpNZ44/45HNFをEcoRIで消化した断片をマルチプライムラベリングシステム(アマシ

ラム社製)で、 ^{32}P 標識したプローブDNA である。

その結果、プローブDNA と相同な配列が組み換えHVT にも存在することが判明した。

実施例 16. 組み換えHVT 感染細胞での外来抗原の発現確認 (蛍光抗体法)

組織培養用チャンバースライド上で、上記組み換えHVT 感染細胞をCEF とともに37℃でプラークが出現するまで培養し、冷アセトンで固定した。

発現した抗原を検出するために、一次抗体抗体として以下のものを用いた。 β -ガラクトシダーゼの検出には、抗 β ガラクトシダーゼウサギ抗血清 (ポリクローナル抗体: Organon Teknica N. V. 社製)、NDV-HNタンパク質及びFタンパク質の検出には、NDVワクチン免疫鶏血清を、それぞれ 500倍にPBS で希釈して用いた。IBDV-VP2 タンパク質の検出には、抗VP-2 モノクローナル抗体GK-5 (Yamaguchi T., et al., Avian Dis., 40 : 501-509 (1996))をPBS で 100倍に希釈して用いた。

標識抗体としては、FITC標識抗ニワトリIgG 抗体、FITC標識抗マウスIgG 抗体、FITC標識抗ウサギIgG 抗体 (いずれもハーランセラボ社製) を、それぞれ使用時にPBS で 100倍に希釈した。

上記の抗体を含む各溶液を冷アセトンで固定したチャンバースライド上の細胞と接触させ、室温 100%湿度で約一時間放置し、PBS で三回洗浄した。この後、FITC結合抗鶏イムノグロブリンまたは抗マウスIgG の希釈液とともに、約一時間、室温にて反応させた。その後、PBS で三回洗浄し、蛍光励起波長光(493.5nm) 下で顕微鏡観察して反応性を調べた。

対照ウイルスとしてHVT 親株FC-126 を感染させ、この親株ウイルスを感染させた細胞を対照細胞として使用した。結果を表 2 に示

した。

表 2 一次抗体に対する反応性

感染ウイルス	抗HN Mab	抗F Mab	抗VP 2 Mab	抗 β -gal
HF002	—	—	+	+
HF003	—	—	+	+
HF004	+	+	—	+
HF005	+	+	—	+
HF006	+	+	+	+
HF007	+	+	+	+
FC126	—	—	—	—
非感染細胞	—	—	—	—

表中、Mab はモノクローナル抗体を表わす。+：反応、—：反応せず

NDV 抗原遺伝子を組み込んだ組み換えHVT は抗NDV モノクローナル抗体と反応し、IBDV-VP 2 遺伝子を組み込んだ組み換えHVT は抗VP 2 モノクローナル抗体と反応した。

この結果から、各組み換えHVT は、挿入した遺伝子がコードするタンパク質を発現していることが確認された。

実施例17. 鶏ワクチンのNDV に対する効果実験(SPF鶏)

実施例14で得られた組み換えHVT のワクチンの効果を判定するためにワクチン効果実験を実施した。

各群10羽の試験用SPF 鶏 (Line M、日本生物科学研究所) に、表2に示す組み換えHVT を接種した。陽性対照群にはNDV の市販の生ワクチンを接種し、陰性対照群は未接種とした。

試験用SPF 鶏が孵化したときに、各組み換えHVT を、鶏の背部皮下に 10^4 TCID₅₀ となるように26Gの注射針をつかって接種した。陽性対照群に使用した市販のNDV 生ワクチン (日本生物科学研究所) は、4日齢の雛に用法通り点眼接種した。

接種4週後に、各群の鶏に強毒NDV ウイルス (Sato株) を 10^4 PFU となるように右大腿部にチャレンジした。チャレンジ後約2週間

までの鶏の生死及びNDV の発症の有無を観察し、生存率を指標として効果を判定した。

NDVウイルスをチャレンジする前に各鶏から採血を行い、各鶏の血清中のNDV に対する赤血球凝集抑制抗体の検出を行った。測定は市販されているNDV 赤血球凝集素（日本生物科学研究所）の使用説明書に従った。結果は表 3 に示した。

表 3 組み換えHVT のNDV 攻撃試験結果（その 1）

接種ウイルス	生存鶏数／試験鶏数	生存率（％）
HF004	10／10	100
HF005	10／10	100
HF006	10／10	100
HF007	10／10	100
FC126	0／10	0
NDV市販ワクチン	10／10	100
非接種	0／10	0

組み換えHVT を接種した鶏では、NDV のチャレンジに対して 100％感染防御がなされた。HI抗体価はFC126 接種鶏群と非接種鶏群で 2 倍以下という低い値であったのに対して、他の群では全鶏128 倍から1024倍であった。

以上の結果から、各組み換えHVT によってNDV に対する感染防御能が接種鶏に付与されていることが明らかとなった。

実施例18. 鶏ワクチンのIBDVに対する効果実験（SPF鶏）

実施例14で得られた組み換えHVT のワクチン効果を判定するために、ワクチン効果実験を実施した。

各群10羽の試験用SPF 鶏（Line M、日本生物科学研究所）に、HF 003 、および親株ウイルスであるFPV をそれぞれ接種した。陽性対照群にはIBDVの市販のワクチンを接種し、陰性対照群は非接種とした。

試験用SPF 鶏が孵化したときに、各組み換えHVT を、鶏の背部皮

下に 10^4 TCID₅₀となるように26Gの注射針をつかって接種した。陽性対照群に使用した市販のNDV 生ワクチン（北里研究所）は、16日齢の雛に用法通り点眼接種した。

生ワクチン接種17日後に、各群の鶏に強毒IBDVウイルス（Okayama株）を 1.5×10^3 EID₅₀となるように経口でチャレンジした。チャレンジ後約3日での鶏の生死を観察した。その後生存した鶏を屠殺し、IBDVの発症の有無をファブリキウス囊の病変形成状態を指標として効果を判定した。ファブリキウス囊の病変形成状態は、出血（A）、囊内チーズ様浸出物形成（B）、黄色病変（C）、ゼリー様浸出物形成（D）の4点で判定した。各病変スコアは、病変を形成した鶏羽数で表わし、スコア合計で接種ワクチンの効果を判定した。結果を表4に示した。

表4 組み換えHVT のIBDV攻撃試験結果

接種ウイルス	生存鶏数	発症鶏	A	B	C	D	病変スコア
HF003	10/10	6/10	2/6	1/6	3/6	0/6	6
FPV	9/10	9/10	7/9	6/9	8/9	6/6	27
市販ワクチン	10/10	3/10	1/3	0/3	2/3	0/3	3
非接種	10/10	3/10	7/10	9/10	8/10	5/10	29

組み換えHVT を接種した鶏では、IBDVのチャレンジに対して市販のワクチンとほぼ同等の感染防御能を示した。

この結果から、組み換えHVT の接種によってIBDVに対する感染防御能が付与されていることが示された。

実施例19. 鶏ワクチン効果実験（移行抗体保有鶏）

実施例14で得られた組み換えHVT が移行抗体を保有している鶏に対してもワクチン効果を発揮するかどうかについて、市販鶏に接種して調べた。

使用した鶏は、市販されている白色レグホン（Dekalb鶏、神奈川養鶏連合会）から生まれた初生雛である。HF004 とHF006 を実施例

17と同様に背部皮下接種した。

このとき同じロットの雛20羽から、心臓採血によって血液を採取し、血清を得た。移行抗体が完全になくなる8週後に実施例17と同様にNDVによるチャレンジを行い、生存率の有無で感染防御能を評価した。結果を表5に示した。

表5 組み換えHVTのNDV攻撃試験結果（その2）

接種ウイルス	生存鶏数／試験鶏数	生存率（％）	HI抗体価
HF004	19／20	95	16
HF006	18／20	90	15.5
FC126	0／20	0	<2
NDV市販ワクチン	14／19	74	8
非接種	0／20	0	<2

なお、初生齢のHI抗体価は97であった（20羽の平均値）。

この結果から明らかなように、組み換えHVTを接種した群ではNDVのチャレンジに対してほぼ完璧なワクチン効果が示された。また、チャレンジ時のHI抗体価もFC126接種群（<2）や非接種群（<2）と比較して明らかに高い値を示した（16および15.5）。

また、HF004とHF006の間ではHI抗体価に有意な差もなく、挿入抗原の多少に関わらず、鶏に対して有意な免疫効果を与えることが示された。

これらの結果から明らかなように、本明細書で示した組み換えHVTは、すべて挿入抗原遺伝子が由来する疾病の効果的なワクチンになった。そればかりでなく、移行抗体の影響を受けない。

また、挿入抗原の多少に関わらず効果を発揮したことから、多価組み換えHVTワクチンとしての有用性が示された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、七面鳥ヘルペスウイルスゲノム中の非翻訳領域である遺伝子領域に外来遺伝子が挿入された組み換え七面鳥ヘルペ

スウイルスおよび当該組み換え七面鳥ヘルペスウイルスを含有する
ワクチンが提供される。

請 求 の 範 囲

1. ゲノム中の非翻訳領域である遺伝子領域に外来遺伝子が挿入された、鳥類感染型組み換えヘルペス属ウイルス。
2. 前記ウイルスが、七面鳥ヘルペスウイルスまたはマレック病ウイルスである、請求項1に記載の組み換えウイルス。
3. 前記非翻訳領域が、ヒト単純ヘルペスウイルス各オープン・リーディング・フレームに相当する七面鳥ヘルペスウイルスまたはマレック病ウイルスのオープン・リーディング・フレームの間に存在する非翻訳領域である、請求項1又は2に記載の組み換えウイルス。
4. 前記外来遺伝子の挿入部が、(1) UL44とUL45の間、(2) UL45とUL46の間、(3) UL41とUL42の間、(4) UL40とUL41の間、(5) gB遺伝子の下流領域、(6) UL53とUL54の間、および(7) UL36とUL37からなる群から選ばれる少なくとも1箇所の挿入部位である請求項3に記載の組み換えウイルス。
5. 前記外来遺伝子が、鳥類の感染症の病原体に由来する遺伝子である請求項1～4のいずれかに記載の組み換えウイルス。
6. 前記鳥類感染症の病原体がウイルス、細菌、真菌、および原虫から成る群から選ばれた病原体である、請求項5に記載の組み換えウイルス。
7. 前記鳥類感染症の病原体が、ニューカッスル病ウイルス(NDV)、ガンボロ病ウイルス(IBDV)、伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)、伝染性気管支炎ウイルス(IBV)、マイコプラズマ(MG)、およびコクシジウムからなる群から選ばれる病原体である、請求項5又は6に記載の組み換えウイルス。
8. 前記外来遺伝子上流にプロモーターを有する、請求項1～

7 のいずれか 1 項に記載の組み換えウイルス。

9. 請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載された組み換えウイルスを有効成分とする鶏用ワクチン。

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<100 > Nippon Zeon Co. Ltd.

<110 > Fowl-infective recombinant herpes virus and recombinant vaccine using the same

<130 > F898-PCT

<150 > JP 9-271445

<151 > 1997-10-03

<160 > 23

<210 > 1

<211 > 25

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 1

ccccgaattc atggaagaaa ttcc

25

<210 > 2

<211 > 40

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 2

cgcgggcctt attggccaaa acacacctct aacggttact

40

<210 > 3

<211 > 40

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 3

gcgcggccaa taaggccaaa acacagtaac cgtagaggt

40

<210 > 4

<211 > 28

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 4

ccccaagctt tcaagtata ctgcgtga

28

<210 > 5

<211 > 37

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 5

gcgcggccaa taaggccaac atcgggacgt acatcat

37

<210 > 6

<211 > 40

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 6

gcgcggcctt attggcctta aataccgcgt ttggagtaaa

40

<210 > 7

<211 > 24

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 7

agctgcccc ccggcaagct tgca

24

<210 > 8

<211 > 17

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 8

tcgacatttt tatgtac

17

<210 > 9

<211 > 22

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 9

aattcggccg ggggggcccag ct

22

<210 > 10

<211 > 14

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 10

ggcccccccg gccg

14

<210 > 11

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 11

agcttgccaa taaggctgca

20

<210 > 12

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 12

atggcccgcc ggctgaccgc

20

<210 > 13

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 13

gcggtcagcc ggcgggcat

20

<210 > 14

<211 > 27

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 14

ggtaaactgc agacttgca gt

22

<210 > 15

<211 > 22

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 15

actgccaagt ctgcagtta cc

22

<210 > 16

<211 > 22

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 16

atggcccgcc atgcattatg cc

22

<210 > 17

<211 > 22

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 17

ggcataatgc atggcgggcc at

22

<210 > 18

<211 > 21

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 18

cgggagctct aattgtttgt g

21

<210 > 19

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 19

cgggaattcg cttacaattt

20

<210 > 20

<211 > 21

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 20

cgggggccct aattgtttgt g

21

<210 > 21

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 21

cggggtaccg cttacaattt

20

<210 > 22

<211 > 24

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 22

gcaagcttgc gatgacgaac ctgc

24

<210 > 23

<211 > 25

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<223 > Synthetic oligonucleotide for primer

<400 > 23

gcgtcgactc acctccttag ggccc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/38, 7/01, A61K39/245, 39/255

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/38, 7/01, A61K39/245, 39/255

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 9-20682, A (Rhone Merieux S.A.), 21 January, 1997 (21. 01. 97) & EP, 719864, A & FR, 2728795, A	1-3, 5-9
A	WO, 96/21034, A (RHONE MERIEUX), 11 July, 1996 (11. 07. 96) & AU, 9644898, A	1-9
A	JP, 8-337539, A (Rhone Merieux S.A.), 24 December, 1996 (24. 12. 96) & EP, 728842, A	1-9
A	WO, 95/29248, A (RHONE MERIEUX), 2 November, 1995 (02. 11. 95) & EP, 757722, A	1-9
A	WO, 96/05291, A (SYNTRO CORPORATION), 22 February, 1996 (22. 02. 96) & EP, 776361, A	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 9 November, 1998 (09. 11. 98)

Date of mailing of the international search report
 17 November, 1998 (17. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04468

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAPHAEL DARTEIL, MICHEL BUBLOT, ELIANE LAPLACE, JEAN-FRANCOIS BOUQUET, JEAN-CHRISTOPHE AUDONNET, MICHEL RIVIERE, "Herpesvirus of Turkey Recombinant Viruses Expressing Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP2 Immunogen Induce Protection against an IBDV Virulent Challenge in Chickens", Virology, 1995, Vol. 211, No. 2, P.481-490	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/38, 7/01, A61K39/245, 39/255

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/38, 7/01, A61K39/245, 39/255

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 9-20682, A (ローヌ メリユ ソシエテ アノニム) 21. 1月. 1997 (21. 01. 97) & EP, 719864, A & FR, 2728795, A	1-3, 5-9
A	WO, 96/21034, A (RHONE MERIEUX) 11. 7月. 1996 (11. 07. 96) & AU, 9644898, A	1-9
A	JP, 8-337539, A (ローヌ メリユ ソシエテ アノニム) 24. 12月. 1996 (24. 12. 96) EP, 728842, A	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 11. 98

国際調査報告の発送日

17.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之



4B

3449

電話番号 03-3581-1101 内線 9165

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 95/29248, A (RHONE MERIEUX) 2. 11月. 1995 (02. 11. 95) & EP, 757722, A	1-9
A	WO, 96/05291, A (SYNTRO CORPOLATION) 22. 2月. 1996 (22. 02. 96) & EP, 776361, A	1-9
A	PAPHAEL DARTEIL, MICHEL BUBLLOT, ELIANE LAPLACE, JEAN-FRANCOIS BOUQUET, JEAN-CHRISTOPHE AUDONNET, MICHEL RIVIERE, "Herpesvirus of Turkey Recombinant Viruses Expressing Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP2 Immunogen Induce Protection against a n IBDV Virulent Challenge in Chickens", Virology, 1995, Vol. 211, No. 2, P. 481-490	1-9